

PENENTUAN KERAPATAN INOKULUM *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DENGAN SPEKTROFOTOMETER

Determination of Inoculum Densities of Xanthomonas campestris pv. campestris with Spectrophotometer

Y.M. Sugi Maryudani¹ dan Nursamsi Pusposendjojo¹

Program Fitopatologi

Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRACT

The inoculum densities of bacterial plant pathogens are able to be determined with plate-count technique or turbidity measurements. The first ones is used for counting the life cells of bacteria; it needs 3 to 5 days incubation periods. The second ones are used for counting the whole cells of life and dead cells at once.

Combining the plate-count technique with turbidity measurement with spectrophotometer showed the relationship between the number of life cells and the absorbance or transmittance values of the bacterial suspension.

The spectrophotometer measurement was done with Nutrient Broth medium and sterilized water for suspending *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* at the wavelength of 640 nm.

The Nutrient Broth medium method based on the absorbance values produced $Y' = 0.0696559 X' - 1.02377$ with $r^2 = 0.80$; based on the transmittance values produced $Y' = -0.0200303 X' + 1.9148682$ with $r^2 = 0.78$.

The sterilized water method based on the absorbance values produced $Y' = 0.00352082 X' - 1.1744672$ with $r^2 = 0.09$; based on the transmittance values produced $Y' = -0.00140648 X' + 1.9148682$ with $r^2 = 0.00006$.

All the data were measured in the incubation periods of 0-6 hours. According to the r^2 values, it concluded that the Nutrient Broth medium method based on the absorbance values is the best way to determine the inoculum densities of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Key words: bacterial growth – life cells – turbidity measurement – absorbance

PENGANTAR

Kerapatan inokulum menentukan keberhasilan uji patogenisitas suatu penyakit. Pada tanaman kubis gejala busuk hitam dapat terjadi bila tanaman

1: Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

diinokulasi dengan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pada kerapatan 10^6 - 10^7 CFU per ml (Dye, 1980).

Menurut Kiraly *et al.* (1974), kerapatan inokulum bakteri penyebab penyakit tumbuhan dapat ditentukan dengan dua cara, yaitu dengan (a) teknik penghitungan koloni (*plate count technique*) dan (b) pengukuran kekeruhan (*turbidity measurements*) suspensi bakteri. Cara pertama hanya mengetahui jumlah bakteri yang masih hidup, dan pelaksanaannya memerlukan waktu inkubasi; sedang cara kedua pada prinsipnya mengukur sifat fotoelektrik suspensi bakteri, dengan demikian cara ini dapat mengetahui jumlah bakteri yang hidup dan mati tanpa memerlukan waktu inkubasi.

Dalam proses terjadinya penyakit, peranan bakteri yang masih hidup sangat menentukan hasilnya. Mengingat hal ini maka untuk mengetahui kerapatan inokulum dalam waktu singkat sangat diperlukan. Untuk ini penulis bermaksud menggabungkan teknik penghitungan koloni dengan pengukuran kekeruhan menggunakan spektrofotometer. Dengan penggabungan kedua cara tersebut akan diperoleh persamaan garis yang menggambarkan hubungan antara jumlah bakteri yang masih hidup dengan nilai *absorbance* atau *transmittance* suspensi *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Berdasarkan persamaan garis tersebut apabila dibutuhkan kerapatan inokulum pada jumlah tertentu maka nilai *absorbance* atau *transmittance* suspensi bakteri dapat dihitung.

CARA PENELITIAN

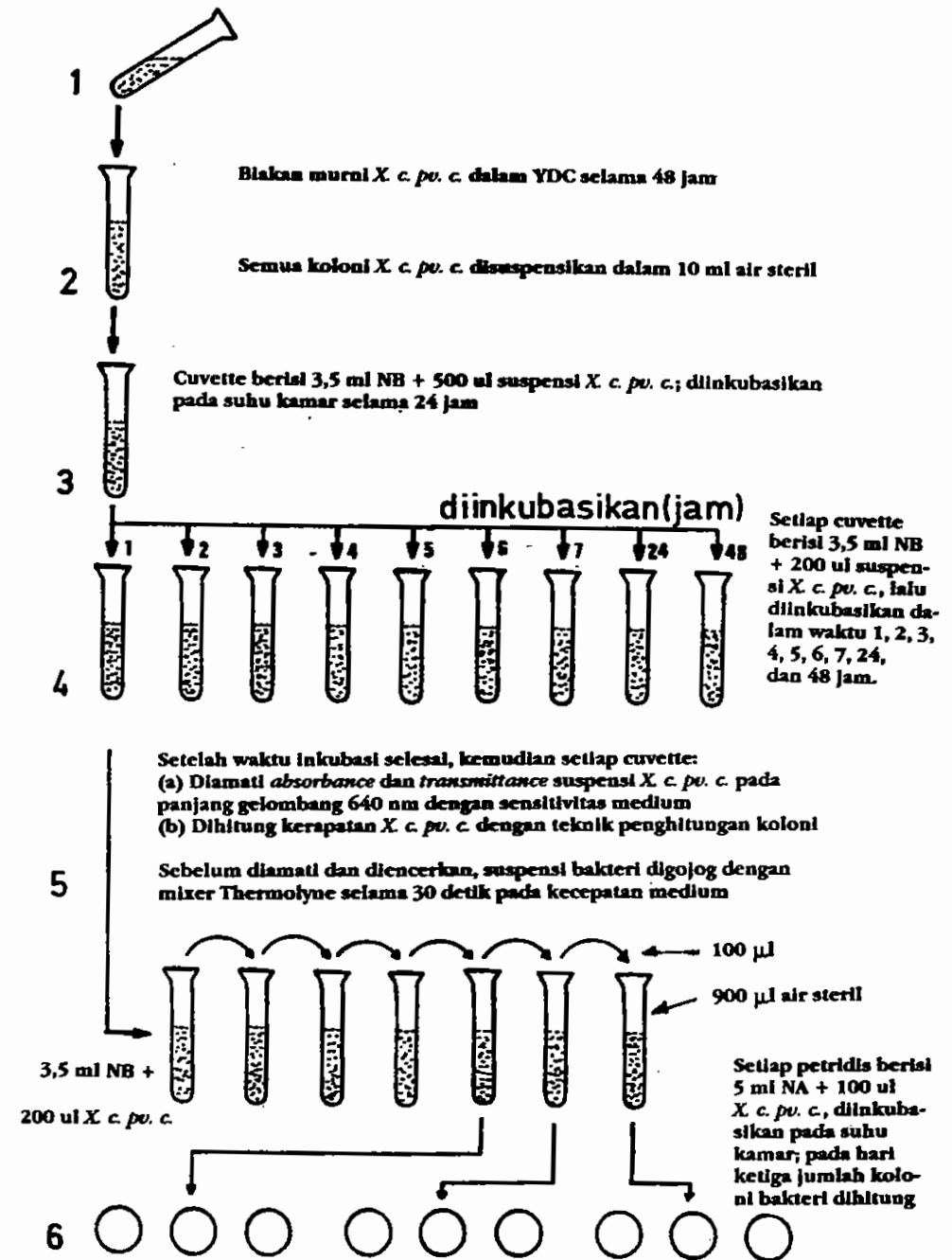
Bahan dan alat. Diperlukan biakan murni bakteri *X. c. pv. campestris* berumur 48 jam pada medium *Yeast Dextrose Calcium Carbonate Agar* (agar YDC); medium *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB); air steril; spectronic 21 UVD, penghitung koloni bakteri model *Dark Field Quebec*; *mixer Thermolyne*; pipet mikro, dan alat-alat gelas lainnya.

Metode. Kerapatan inokulum bakteri dihitung dengan (1) Medium NB dan (2) Air steril sebagai pembuat suspensi bakteri.

Dengan medium NB

Urutan langkahnya:

1. Disiapkan biakan murni *X. c. pv. campestris* berumur 48 jam dalam medium YDC.
2. Semua koloni bakteri disuspensikan dalam 10 ml air steril.
3. Ke dalam cuvette berisi 3,5 ml medium NB steril ditambahkan 500 ul suspensi bakteri, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 24 jam.
4. Disiapkan sembilan buah cuvette masing-masing berisi 3,5 ml medium NB steril. Ke dalam setiap cuvette ditambahkan 200 ul suspensi bakteri dari langkah nomor 3. Kemudian masing-masing cuvette diinkubasikan selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, dan 48 jam pada suhu kamar.



Gambar 1. Penentuan kerapatan *X. c. pv. campestris* dengan medium NB menggunakan spektrofotometer

5. Setelah waktu inkubasi selesai, biakan bakteri digojog dengan mixer Thermolyne selama 30 detik pada kecepatan medium, kemudian:
 - a. Diamati absorbance atau transmittance suspensi bakteri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 640 nm dengan sensitivitas medium.
 - b. Dihitung kerapatan sel bakterinya menggunakan teknik penghitungan koloni dengan pengenceran suspensi bakteri dari 10^{-1} sampai 10^{-10} . Pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} masing-masing suspensi bakteri diambil 300 μ l untuk ditumbuhkan dalam tiga petridis. Setiap petridis berisi 5 ml medium NA untuk menumbuhkan koloni dari 100 μ l suspensi bakteri kemudian diinkubasikan dalam suhu kamar. Pada hari ketiga koloni *X. c. pv. campestris* yang tumbuh dihitung. Dari jumlah koloni bakteri yang tumbuh jumlah bakteri per ml medium dapat dihitung.

Untuk memahami cara kerja ini dapat dilihat skema pada gambar 1.

Dengan air steril

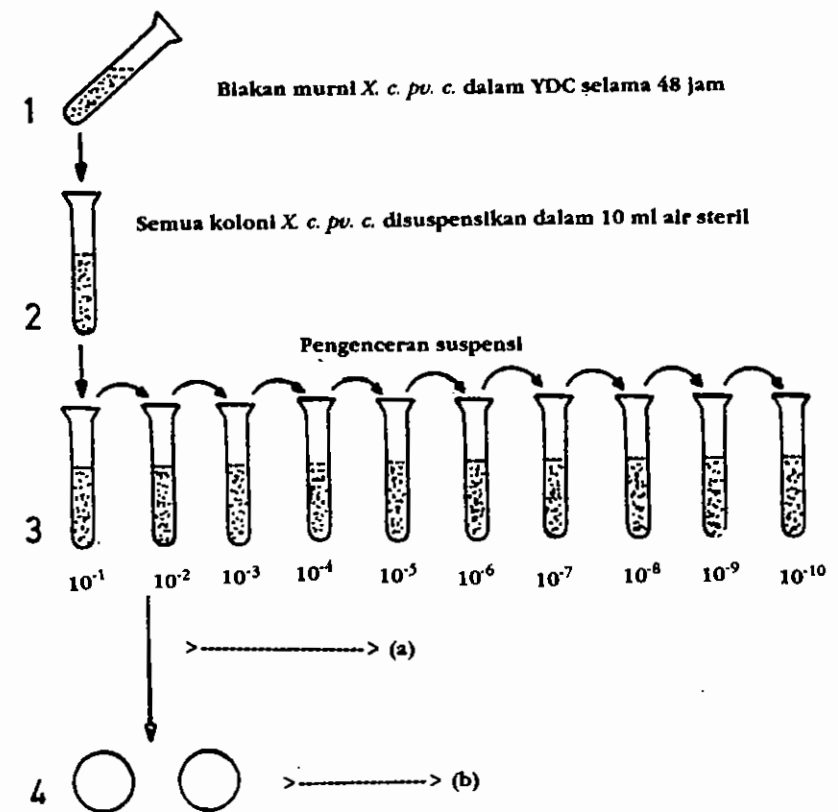
Urutan langkahnya

1. Disiapkan biakan murni *X. c. pv. campestris* berumur 48 jam dalam medium YDC.
2. Semua koloni bakteri disuspensikan dalam 10 ml air steril.
3. Suspensi bakteri diencerkan dengan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} .
4. Pada setiap pengenceran, suspensi *X. c. pv. campestris* kemudian:
 - a. Diamati absorbance atau transmittance-nya pada panjang gelombang 640 nm dengan sensitivitas medium.
 - b. Pada setiap pengenceran, masing-masing suspensi bakteri diambil 200 μ l untuk ditumbuhkan dalam dua petridis. Setiap petridis berisi 5 ml medium NA untuk menumbuhkan koloni bakteri dari 100 μ l suspensi, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar. Pada hari ketiga koloni bakteri yang tumbuh dihitung.

Untuk dapat memahami cara kerja ini dapat dilihat pada gambar 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri *X. c. pv. campestris* yang ditumbuhkan pada medium NB terlihat bahwa fase pertumbuhan eksponensialnya berakhir pada waktu inkubasi enam jam (tabel 1, gambar 3). Data yang dianalisis hanya terbatas pada waktu inkubasi 0-6 jam, karena penelitian ini hanya menghitung jumlah bakteri yang hidup sebelum ada sel yang mati.



(a) Setiap tingkat pengenceran diamati absorbance dan transmittance suspensi *X. c. pv. c.* dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 640 nm dengan sensitivitas medium.

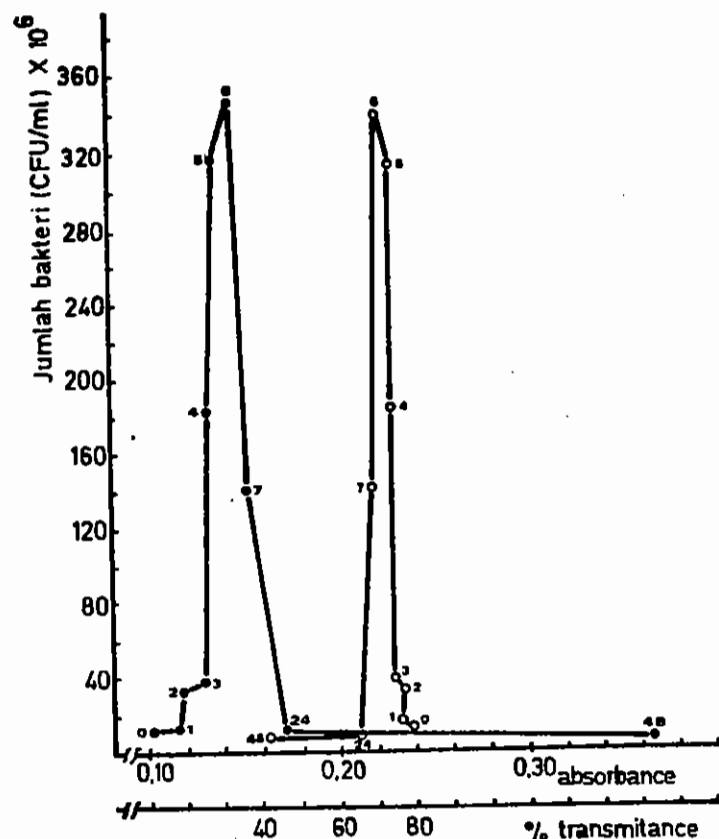
(b) Setiap tingkat pengenceran, suspensi *X. c. pv. c.* diambil 200 μ l untuk ditumbuhkan dalam dua petridis yang berisi NA sebanyak 5 ml. Setiap petridis ditumbuhkan 100 μ l suspensi bakteri.

Sebelum diamati dengan spektrofotometer dan ditumbuhkan dalam medium NA, suspensi *X. c. pv. c.* digojog dengan mixer Thermolyne selama 30 detik dengan kecepatan medium.

Gambar 2. Penentuan kerapatan *X. c. pv. campestris* dengan air steril menggunakan spektrofotometer

Tabel 1. Absorbance, transmittance, dan jumlah *X. c. pv. campestris* yang hidup pada medium NB. Diamati menggunakan spektrofotometer dan teknik penghitungan koloni

Waktu inkubasi (jam)	Absorbance	Transmittance	Jumlah sel bakteri (CFU per ml) ($\times 10^6$)
0	0,105	78,8	11,90
1	0,117	77,2	12,83
2	0,118	76,9	35,40
3	0,133	75,2	37,96
4	0,135	74,1	184,10
5	0,138	73,6	329,46
6	0,144	72,5	346,60
7	0,154	70,9	140,56
24	0,174	68,0	6,25
48	0,370	43,0	6,05



Gambar 3. Pertumbuhan *X. c. pv. campestris* dalam medium NB dalam waktu inkubasi dari 0 sampai 48 jam

Pada tabel 1 hubungan antara jumlah bakteri dengan nilai absorbance suspensi dapat digambarkan dengan persamaan garis $Y' = 0.0696559 X' - 1.02377$ dengan koefisien determinasi (r^2) = 0,80; hubungannya dengan nilai transmittance mempunyai persamaan garis $Y' = -0.0200303 X' + 1.9148682$ dengan $r^2 = 0,78$.

Kerapatan inokulum yang diamati dengan air steril nilai absorbance dan transmittance yang diperoleh tidak seiring dengan tingkat pengenceran suspensi bakteri (tabel 2).

Tabel 2. Absorbance, transmittance, dan jumlah bakteri *X. c. pv. campestris* yang hidup dalam air steril. Diamati menggunakan spektrofotometer dan teknik penghitungan koloni.

Pengenceran	Absorbance	Transmittance	Jumlah sel bakteri (CFU per ml)
10^{-1}	0,093	82,7	*)
10^{-2}	0,075	86,7	*)
10^{-3}	0,074	87,1	*)
10^{-4}	0,070	87,1	6630
10^{-5}	0,071	87,1	3190
10^{-6}	0,066	87,0	1575
10^{-7}	0,067	87,0	1240
10^{-8}	0,069	87,2	700
10^{-9}	0,069	87,7	25
10^{-10}	0,067	87,7	15

Keterangan:

*) Koloni bakteri sangat rapat sehingga sukar dihitung

Air steril: absorbance = 0,083

transmittance = 97,14

Pada tabel 2, hubungan antara jumlah bakteri *X. c. pv. campestris* dengan nilai absorbance suspensi dapat digambarkan dengan persamaan garis $Y' = 0.00352082 X' - 1.1744672$ dengan $r^2 = 0,09$; hubungannya dengan nilai transmittance mempunyai persamaan garis $Y' = -0.00140648 X' + 1.9446942$ dengan $r^2 = 0,00005$.

Koefisien determinasi persamaan garis data tabel 2 menunjukkan angka yang kecil. Hal ini mungkin karena penggunaan panjang gelombang yang tidak tepat, akibatnya absorbance yang dicatat detektor tidak maksimal. Oleh Vidaver (1980) panjang gelombang 640 nm digunakan untuk menghitung kerapatan bakteri yang disuspensikan dalam medium NB, NBY, atau medium 532. Oleh Sastrohamidjojo dan Sri Noegrohati (1985) dinyatakan bahwa hubungan absorbance sebagai fungsi panjang gelombang dikenal sebagai spektrum serapan. Sedang oleh Clark (1964) dinyatakan bahwa suatu bahan biasanya mempunyai beberapa puncak penyerapan pada berbagai macam panjang gelombang. Untuk analisis selanjutnya dipilih panjang gelombang yang mempunyai puncak tertinggi, yang berarti mempunyai nilai absorbance yang maksimal. Dengan demikian, untuk penghitungan kerapatan bakteri dengan menggunakan air steril, perlu dicari dahulu spektrum penyerapannya dan

dipilih panjang gelombang yang menunjukkan puncak yang tertinggi. Penggunaan panjang gelombang 640 nm untuk air steril sebagai pembuat suspensi bakteri tidaklah cocok.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dengan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Spektrofotometer dapat digunakan untuk menghitung kerapatan suspensi bakteri dengan ketentuan panjang gelombang yang digunakan yang menghasilkan nilai absorbance yang maksimal. Bila hal ini belum diketahui spektrum penyerapan medium atau cairan yang digunakan untuk membuat suspensi;
2. Mengingat spektrofotometer mengukur absorbance atau transmittance yang nilainya dipengaruhi oleh komposisi medium atau cairan dan kekeruhan medium atau cairan karena adanya sel bakteri di dalamnya maka persamaan garis regresi yang diperoleh hanya berlaku bagi medium atau cairan dan bakteri tertentu;
3. Dalam percobaan ini, berdasarkan nilai koefisien determinasi persamaan garisnya maka:
 - a. metode yang menggunakan medium NB lebih baik daripada yang menggunakan air steril saja,
 - b. penghitungan kerapatan bakteri yang hidup lebih baik berdasarkan nilai absorbance daripada nilai transmittance-nya.

DAFTAR PUSTAKA

- Clark, J.M., 1964, *Experimental Biochemistry*, W.H. Freeman and Co., San Fransisco.
- Dye, D.W., 1980, *Xanthomonas*, p.45-49, dalam Schaad (ed.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS, Minnesota.
- Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F. dan Voros, J., 1974, *Methods in Plant Pathology*, Elsevier Science Publ. Co., Amsterdam.
- Sastrohamidjojo, H. dan Sri Noegrohati, 1985, *Spektroskopi Ultraviolet dan terlihat*, Lab. Analisa Kimia/Fisika Pusat UGM, Yogyakarta.
- Vidarver, A.K., 1980, *Corynebacterium*, p.12-16, dalam Schaad (ed.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, APS, Minnesota.